

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

Die Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa* mit Pyocinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Peter Kirchner
Tierarzt aus Berlin

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545914_0005

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

Die Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa* mit Pyocinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Peter Kirchner
Tierarzt aus Berlin

Gießen 1971

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät

in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmle

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel



Tag der mündlichen Prüfung: 8./9. Dezember 1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 Einleitung	1
2.0 Literaturübersicht	4
2.1 Serologische Typisierung	4
2.2 Phagentypisierung	6
2.3 Pyocin-Typisierung	7
3.0 Material	12
3.1 Pseudomonaden	12
3.11 Indikatorstämme	12
3.12 Standard-Pyocin-Stämme A - U	12
3.2 Nährmedien	12
4.0 Methoden	15
4.1 Identifizierung der Pseudomonaden	15
4.11 Morphologie	15
4.12 Färbemethoden	15
4.121 Gramfärbung	15
4.122 Geißelfärbung	15
4.13 Biochemische Verfahren	17
4.131 Cytochromoxidase-Reaktion	17
4.132 Oxidative Glucose-Spaltung	17
4.133 Hämolyse	18
4.134 Gelatinespaltung	18
4.135 Verhalten in Lackmusmilch	18
4.136 Farbstoffbildung	18
4.137 Wachstum in synthetischem Medium	19
4.138 Elastase-Nachweis	19
4.139 Wachstum bei 42°C im Glycerol-Mannitol-Acetamid-Cetrimid-Agar	20

4.2	Typisierung der <u>Ps. aeruginosa</u> -Kulturen	21
4.21	Herstellung der Mitomycin C-Lösung	21
4.22	Gewinnung von Pyocin	21
4.23	Zusammenstellung des Pyocin-Musters der Kulturen	22
4.24	Pyocin-Empfindlichkeit	23
4.241	Abgrenzung von Phagenreaktionen gegenüber pyocinbedingten Lysiszonen	24
4.25	Stabilität des Pyocins	26
4.26	Pyocin-Bildung pro Zeiteinheit	26
5.0	Ergebnisse	28
5.1	Identifizierung der 50 Testkulturen	28
5.11	Morphologie	28
5.12	Färbung	29
5.13	Biochemische Reaktionen	30
5.2	Typisierungsergebnisse	33
5.21	Versuche zur Erzielung eines optimalen Wachstums der Indikatorkulturen	33
5.22	Pyocin-Produktion	35
5.23	Pyocin-Empfindlichkeit	36
5.24	Bestimmung identischer Stämme	45
5.3	Stabilität des Pyocins	45
5.4	Pyocin-Bildung pro Zeiteinheit	46
5.5	Quantitative Bestimmung der Standard- Pyocine A - U	54
6.0	Diskussion	57
7.0	Zusammenfassung	62
8.0	Literaturverzeichnis	63
	Lebenslauf	

1.0 EINLEITUNG

Pseudomonas aeruginosa hat in den letzten Jahrzehnten als Erreger verschiedenartiger Krankheitsbilder zunehmend an klinischer Bedeutung gewonnen. Bereits 1862 wurde der Keim als Ursache der sogenannten "blauen Eiterung" von LÜCKE⁴¹ erwähnt, in der Folgezeit jedoch von den meisten Bakteriologen in seiner pathogenen Bedeutung unterschätzt. Das derzeit teilweise massive Auftreten von Pseudomonas-Infektionen in manchen Krankenhäusern ist vergleichbar mit der Ausbreitung der Staphylokokken-Infektionen und läßt Autoren wie PULVERER und KORTH⁵⁰ sogar von einem Pseudomonaden-Hospitalismus sprechen.

Die häufige Isolierung dieses Erregers wird im Zusammenhang mit einigen seiner spezifischen Eigenarten erklärlich. Wegen der Fähigkeit einzelner Stämme auch bei niedrigen Temperaturen zu wachsen und seiner relativ hohen Resistenz gegen die meisten gebräuchlichen Antibiotika und einige Desinfektionsmittel, kann Ps. aeruginosa in einer Umgebung überleben, die für viele andere Bakterien nur ungünstige Wachstums-Bedingungen bietet (BOOTH³). Hinzu kommt die weite Verbreitung des Keims im Lebensbereich von Mensch und Tier (NOBLE und WHITE⁴⁷).

Im Klinikbereich scheint der vermehrte Gebrauch von Breitspektrumantibiotika, Corticosteroiden und Immunsuppressiva der Möglichkeit zur Infektion mit dem Erreger Vorschub zu leisten (TINNE et al.⁵⁸, FINLAND et al.¹⁰). In Krankenhäusern konnte Ps. aeruginosa an vielen Gegenständen und Geräten nachgewiesen werden, die für die Behandlung und Pflege der Patienten verwendet wurden (FIERER et al.⁹, WILLIAMS et al.⁶³, NOBLE und WHITE⁴⁷).

Säuglinge sind durch den Erreger besonders gefährdet. CASELITZ⁶ berichtet über oft mit hoher Mortalität verlaufende Diarrhöen auf Säuglingsstationen, wobei vor allem Neugeborene mit schlechtem Allgemeinzustand betroffen waren.

Der gleiche Verfasser gibt als häufigste durch Ps. aeruginosa verursachte Krankheiten an: Gastroenteritis, Meningitis, Empyeme, Otitis, Konjunktivitis, Infektionen der Harnwege, der Haut und des Respirationstraktes. Ebenso werden oft Brand- und Tracheotomiewunden durch den Erreger infiziert (MONCRIEF und TEPLITZ⁴⁴, STONE⁵⁵, LOWBURG et al.⁴⁰).

In der Veterinärmedizin stehen Mastitiden und die Besiedlung des Genitaltraktes beim Rind, sowie vereinzelte Fälle einer tödlich verlaufenden Rhinitis

und Meningitis hämorrhagica beim Schwein im Vordergrund des Krankheitsbildes (TILL⁵⁷, NEUMANN und SEELING⁴⁶, GÖTZE¹³, GOERTTLER¹²).

Wegen der beschriebenen breiten Streuung des Keimreservoirs ist es zur Klärung von Infektionszusammenhängen notwendig, einen einzelnen Stamm von Ps. aeruginosa aufgrund bestimmter Merkmale so zu beschreiben, daß er von anderen Stämmen der gleichen Keimart unterschieden werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Typisierungsverfahren zu erproben, das die sichere Erkennung und Charakterisierung einzelner Stämme ermöglicht.

2.0 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Serologische Typisierung

In Anlehnung an die Diagnostik von Salmonellen versuchten verschiedene Autoren mit serologischen Methoden eine brauchbare Einteilung von Ps. aeruginosa-Kulturen zu erarbeiten. 1916 vermochte TROMMSDORF⁵⁹ mit dem Agglutinationstest aus 27 Ps. aeruginosa-Kulturen 5 Gruppen abzutrennen. Van den ENDE⁶⁰ verwendete 1952 den Präzipitationstest für die Antigenanalyse von Ps. aeruginosa und erarbeitete mit Trichloressigsäure-Extrakten 6 Gruppen aus 24 Stämmen, von denen er 4 mittels spezifischer Phagenreaktion nochmals unterteilen konnte. KÖHLER³⁵ bestätigte die gute Verwendbarkeit des Präzipitationstestes mit Formamid-Extraktion von Bakterien. Es gelang ihm damit 383 Stämme in 8 serologische Gruppen einzuordnen.

Während KÖHLER³⁵ mit dem Agglutinationstest keine brauchbaren Ergebnisse erzielen konnte, stellte HABS¹⁹ mit dieser Methode eine serologische Gruppeneinteilung unter Berücksichtigung der O-Antigene von Ps. aeruginosa auf. Von 78 Ps. aeruginosa-Stämmen konnten 70 in 12 O-Gruppen aufgeteilt werden. Von diesen 12 O-Gruppen hatten 8 zueinander keine Antigenbeziehungen. KLEINMAIER³² entwickelte dann ein

vereinfachtes Verfahren zur O-Gruppenbestimmung mit dem Objektträger-Agglutinationstest, bei dem die gleichen Ergebnisse wie mit dem Röhrchentest erzielt wurden. Derselbe Verfasser³³ wies ebenfalls nach, daß zwischen den Ergebnissen der Präzipitationsmethode und denen des Agglutinationstestes prinzipielle Übereinstimmungen bestehen. Die Vermutung, daß O-Antigene und präzipitierende Antigene identisch sind, konnte experimentell bestätigt werden, da nach beiden Methoden die gleichen 12 O-Gruppen gefunden wurden. MIKKELSEN^{42,43} ordnete mit Hilfe des Röhrchenagglutinationstestes und hitzebehandelter Antigen suspension 958 Ps. aeruginosa-Stämme in 14 O-Gruppen ein. Zwölf dieser Gruppen entsprachen denen, die auch von HABS¹⁹ beschrieben wurden. 75 % der Stämme waren mit dieser Methode erfaßbar. 55 % aller untersuchten Kulturen gehörten den Gruppen 6, 2, 5, 3 und 11 an.

Weitere serologische Differenzierungen wurden durch die Beschreibung der thermolabilen H-Antigene von Ps. aeruginosa möglich. Auf diesem Gebiet konnten KLEINMAIER et al.³⁴ feststellen, daß die thermolabilen Antigene gruppenunabhängig sind und mit ihrer Hilfe eine Unterscheidung innerhalb von Stämmen der gleichen O-Gruppe möglich wird.

Ein anderes Antigenschema benutzten VERDER und EVANS⁶². Ebenfalls mit der Agglutinationsmethode

unter Verwendung der O- und H-Antigene unterschieden die Verfasser in O-Gruppen und O-Typen. Zusätzlich wurden 10 H-Faktoren entdeckt, die nochmals aus 8 verschiedenen Varietäten bestanden. Mit Hilfe dieses Schemas wurden 326 Ps. aeruginosa-Stämme auf der Basis der O- und H-Antigene in 29 serologische Typen unterteilt.

Trotz dieser Befunde hat sich die serologische Typisierung von Ps. aeruginosa in der Laboratoriums- praxis nicht durchsetzen können. Einmal war die Herstellung der spezifischen Antiseren relativ aufwendig, zum anderen konnten einzelne Stämme damit nicht hinreichend charakterisiert werden.

2.2 Phagentypisierung

Die Typisierung von Ps. aeruginosa wurde außerdem mit Phagen versucht. Eine grundlegende Arbeit für die Phagentypisierung wurde von Van den ENDE⁶¹ 1952 veröffentlicht. GOULD¹⁵ isolierte Testphagen und erzielte damit gute Typisierungsergebnisse. Nur 11 von 459 Stämmen reagierten nicht mit dem von GOULD¹⁵ verwendeten Phagen. Die übrigen phagentypisierten Stämme wurden in 6 Gruppen unterteilt. SUTTER et al.⁵⁶ typisierten mit einem standardisierten System von 18 Phagen 270 von 317 Kulturen. GRÜN, PILLICH und HEYN¹⁸ führten die Phagenuntersuchungen fort, mußten aber

erkennen, daß die Interpretation der durch die Lysotopie erhaltenen Befunde sehr schwierig war. Unter 130 Stämmen kamen 47 verschiedene Typen vor. Die Anzahl der mit Phagen typisierbaren Stämme wird in der Literatur (GOULD et al.¹⁴, POSTIC et al.⁴⁹, GRABER et al.¹⁷, LINDBERG et al.³⁹) mit 68 % bis 92,5 % angegeben. SJÖBERG und LINDBERG⁵³ schlugen deshalb vor, ähnlich wie bei der Lysotopie von Staphylococcus aureus, einen standardisierten, international vereinbarten Phagensatz zu verwenden, der zu einer einheitlichen Beurteilung führen könnte. Für die Differenzierung und Charakterisierung einzelner Ps. aeruginosa-Stämme schien die Phagentypisierung in Verbindung mit der serologischen Gruppierung ein wertvolles Hilfsmittel zu sein. In der Methodik war sie allerdings ebenfalls sehr aufwendig.

2.3 Pyocin-Typisierung

Die Verwendung der Pyocine zur Charakterisierung von Ps. aeruginosa-Stämmen hat in der Epidemiologie dieser Keime ein neues Feld eröffnet. JACOB²⁶ erwähnte bereits 1953 ein Pyocin und stellte fest, daß es nur mit einigen Ps. aeruginosa-Stämmen reagierte. Damit unterschied es sich von anderen Ps. aeruginosa-Produkten, wie dem antibiotisch wirksamen Pyocyanin oder der hauptsächlich gegen Staphylokokken wirksamen

"Pyocyanase". Das Pyocin wurde nach Auflösung von Ps. aeruginosa-Zellen frei und war dann im Kulturmedium nachweisbar. Der Verfasser konnte die Menge dieses Bacteriocins durch vorherige Bestrahlung der Ausgangskultur mit ultravioletem Licht erhöhen. Er vermutete, daß Pyocin sich an "Rezeptoren" pyocinempfindlicher Ps. aeruginosa-Zellen anheftete, und daß ein Pyocin-"Partikel" wahrscheinlich den Tod der Bakterienzelle verursachte. JACOB²⁶ ermittelte weiterhin die folgenden physiko-chemischen Eigenschaften des Pyocins: Es war nicht dialysierbar, diffundierte aber relativ schnell im Agar. Nach 2stündigem Zentrifugieren bei 20 000 x g wurde Pyocin nicht sedimentiert. Seine Aktivität wurde nach 30 Min. bei + 60°C und pH 7,0 nicht vermindert. Das Pyocin ließ sich mit 66%igem - 75%igem Ammoniumsulfat ausfällen und teilweise reinigen. Es war relativ resistent gegenüber ultravioletem Licht.

Neuere Forschungen von ISHII et al.²⁵, HIGERD et al.²¹, BRADLEY⁴ und HIGERD et al.²² haben dazu beigetragen, die Ultrastruktur des Pyocins aufzuklären. Es gelang nach einem langwierigem Reinigungsverfahren, die von Ps. aeruginosa gebildeten Pyocin-Partikel elektronenmikroskopisch darzustellen. Diese erwiesen sich als Proteine mit phagenähnlichem Aussehen. Eine kontrahierte und eine nicht kontra-

hierte Form konnten unterschieden werden, wobei die Adsorption an die Zellwand nur mit den nicht kontrahierten Partikeln sichtbar zu machen war.

Da das von einem Ps. aeruginosa-Stamm gebildete Pyocin immer nur mit einer bestimmten Anzahl anderer Ps. aeruginosa-Kulturen reagierte, versuchte man schon bald, diese Eigenschaft für die epidemiologische Typisierung zu benutzen. HOLLOWAY²³ verwendete 3 Indikatorstämme von Ps. aeruginosa und beobachtete sowohl Phagen- als auch Pyocinreaktionen, indem er jeweils eine Öse einer über Nacht gewonnenen Bouillonkultur auf die im Agar wachsenden Indikatorstämme auftröpfte. Bei seinen Versuchen benutzte er hauptsächlich den Unterschied zwischen Phagenlysotopie und Pyocin-Produktion als Basis für die Differenzierung der Stämme. Mit dieser Methode konnte er 214 Kulturen in 18 Gruppen einordnen. In einem weit größeren Umfang führten DARREL und WAHBA⁷ 1964 Typisierungen durch Pyocin-Produktion an über 1000 Ps. aeruginosa-Kulturen durch. Der zu untersuchende Stamm wurde bei ihrem Verfahren in einem Strich in der Mitte einer Petrischale ausgestrichen und nach 24 Stunden bei 37°C mit Chloroform abgetötet. Die abgetöteten Bakterien wurden von der Agaroberfläche mit Objektträgern abgeschabt. Anschließend wurden 12 Indikatorstämme von Ps. aeruginosa rechtwinklig auf die Platten aufgetragen. Nach einer weiteren Bebrütung von 16 Stunden ent-

standen an der Kreuzungslinie zwischen Teststämmen mit Pyocin-Produktion und den empfindlichen Indikatorstämmen Hemmzonen, die abgelesen und dann zu einem Schema zusammengefaßt werden konnten. Elf Pyocin-Typen wurden auf diese Weise ermittelt. Durch Produktion von Pyocin waren 92,4 % der untersuchten Stämme typisierbar. OSMAN⁴⁸ benutzte zur Typisierung anstelle der Pyocin-Produktion die Pyocin-Empfindlichkeit der zu testenden Ps. aeruginosa-Kulturen. Er gewann das Pyocin von 4 Stämmen durch Zentrifugieren der Bouillon und Filtrieren des Überstandes. Mit den 4 Filtraten betropfte er die zuvor dem noch flüssigem Agar beigegebenen Ps. aeruginosa-Kulturen. Ähnlich wie bei den Untersuchungen von DARNEL und WAHBA⁷ erhielt auch OSMAN⁴⁸ ein aus positiven und negativen Reaktionen bestehendes Muster mit dem er 101 Stämme in 10 Typen aufgliederte. Bei den weiteren Versuchen¹¹ wurde die Methode von WAHBA⁷ in modifizierter Form angewendet. Während WAHBA⁷ die Pyocin-Anreicherung im Agar durch eine 24stündige Bebrütung des Teststammes bei 37°C erreichte, konnten GILLIS und GOVAN¹¹ wesentlich bessere Ergebnisse nach 14 Stunden bei 32°C erzielen. Mit 8 Indikatorstämmen typisierten sie 88,4 % von 3227 Kulturen. Insgesamt 36 verschiedene Pyocin-Typen wurden ermittelt. In einer weiteren Arbeit gelang es GILLIS und GOVAN¹⁶,

den am häufigsten auftretenden Pyocin-Typ 1 durch zusätzliche 5 neue Indikatoren in 8 Untertypen einzuteilen.

Die Anzahl der mit der beschriebenen Methodik wegen mangelnder Pyocin-Aktivität nicht erfaßbaren Stämme schwankt in den Angaben anderer Arbeiten zwischen 5 % bei HAMON, VERON und PERRON²⁰, 6,8 % bei ZABRANSKY und DAY⁶⁴ bis zu 12 % bei SJÖBERG und LINDBERG⁵².

FARMER und HERMANN⁸ erweiterten die Typisierungsmöglichkeiten, indem sie sowohl die Pyocin-Wirksamkeit als auch die Pyocin-Empfindlichkeit der unbekannten Kulturen in ihre Untersuchungen einbezogen. Damit hatte sich die Wahrscheinlichkeit, tatsächlich einen einzelnen Stamm epidemiologisch beschreiben zu können, wesentlich erhöht. Es gelang den Verfassern, jedem der von ihnen getesteten 151 Stämme wenigstens ein positives Charakteristikum zuzuordnen und damit eine bisher nicht erreichte Genauigkeit und Vollständigkeit der Pyocin-Typisierung zu erreichen.

3.0 MATERIAL

3.1 Pseudomonaden

Es wurden 50 Pseudomonas-Kulturen verschiedener Herkunft (Tabelle 1) identifiziert und typisiert.

3.11 Indikatorstämme

Zur Prüfung des Pyocin-Produktionsmusters der 50 zu untersuchenden Ps. aeruginosa-Kulturen wurden die 27 Ps. aeruginosa-Indikatorstämme von FARMER und HERMAN⁸ verwendet.*

3.12 Standard-Pyocin-Stämme A - U

Für den Test auf Pyocin-Empfindlichkeit wurden 21 Ps. aeruginosa-Stämme benutzt, die aufgrund ihrer Pyocin-Produktion ausgesucht worden waren.**

3.2 Nährmedien

3.21 Als Nähr- und Anreicherungsmedium wurden Trypticase Soy Broth (TSB)^{***} und Trypticase Soy Agar (TSA)^{****} verwendet. Die Bouillon wurde nach Angaben der Herstellerfirma zubereitet und zu je

* American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (25313 - 25339)

** American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (25340 - 2560)
Sowohl die Indikatorstämme als auch die Standard-Pyocin-Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Lloyd G. Herman, National Institutes of Health, Bethesda, Md., übersandt.

*** Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

**** Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, USA

10 ml in 50-ml-Erlenmeyerkolben bzw. zu je 20 ml in 100-ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und 15 Minuten bei 121°C und 1,1 atü Druck autoklaviert.

Der Agar wurde nach dem Autoklavieren in Petrischalen von 9 cm Ø in einer Schichthöhe von etwa 2 mm ausgegossen und danach zur Sterilitätskontrolle und zur Austrocknung 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.22 Die längere Aufbewahrung der Pseudomonaden erfolgte in einem Lackmusmilch-Medium. Es setzte sich aus 93 ml durch Zentrifugieren entfetteter Vollmilch und 7 ml Kubel-Tiemanns-Lackmuslösung* zusammen. Das Medium wurde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 Minuten in einem Dampftopf fraktioniert "sterilisiert". Danach wurde es in Volumina von 4 ml in sterile Reagenzgläser abgefüllt und mit einer Öse der jeweiligen Kultur beimpft. Nach 48 Stunden Bebrütung bei 37°C konnten die Pseudomonaden über einen Zeitraum von wenigstens einem 3/4 Jahr bei einer Temperatur von + 4°C gelagert und bei Bedarf wieder auf TSA ausgestrichen werden.

3.23 Für den fortlaufenden Gebrauch wurden die Kulturen alle 14 Tage auf frischen TSA übertragen, 48 Stunden bei 37°C bebrütet und anschließend bei einer Temperatur von + 4°C aufbewahrt.

* Firma E. Merck, Darmstadt

Tabelle 1:

Herkunft der Pseudomonaden-Kulturen

Kultur Nr.	Herkunft	
1 - 10	Rind, Milchproben (Kielwein)	*
11	Menschliches Untersuchungsmaterial (Kielwein)	*
12	Schwein, Leber	**
13	Schwein, Leber	**
14	Hund, Pyodermie	**
15	Kalb, Milz	**
16	Bulle, Sperma	**
17	Mensch, Urin	***
18	Mensch, Eiter	***
19	Mensch, Trachealabstrich	***
20-25	Mensch, Urin	***
26	Mensch, Wundabszeß	***
27-29	Mensch, Urin	***
30	Säugling, Stuhl	**
31-39	Menschliches Untersuchungsmaterial	***
40	P-A-7 Menschliches Untersuchungs- material (Liu)	****
41	P-A-103 Mensch, Sputum (Liu)	****
42	117 Menschliches Untersuchungs- material (Liu)	****
43	NCT C 6751 Menschliches Unter- suchungsmaterial (Liu)	****
44-48	Menschliches Untersuchungsmaterial	***
49	Hund, Otitis	*****
50	Rind, Mastitis (190)	*****

- * Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Abtlg. der Hygiene der Milch, Fische und Eier
- ** Institut für Infektionskrankheiten der Tiere der
Universität Gießen
- *** Hygiene-Institut der Universität Gießen
- **** Department of Microbiology University of
Louisville, Kentucky, USA
- ***** Institut für Bakteriologie und Immunologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität
Gießen
- ***** Dr. G. Ziv, Kimron Veterinary Institute
Bet-Dagan, Israel

4.0 METHODEN

4.1 Identifizierung der Pseudomonaden

4.11 Morphologie

Alle 50 Pseudomonas-Kulturen wurden nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C bezüglich ihrer Koloniemorphologie auf TSA überprüft. Zusätzlich wurde versucht, den charakteristischen Trimethylamin-Geruch der ausgestrichenen Kulturen als Kriterium zu verwerten. Zur Feststellung der Beweglichkeit der Bakterien wurde ein Tropfen Kulturflüssigkeit auf einem Objektträger unter einem Phasenkontrastmikroskop* untersucht.

4.12 Färbemethoden

4.121 Gramfärbung

Die zu untersuchenden Pseudomonaden wurden nach Gram⁵⁴ gefärbt und anschließend mikroskopisch beurteilt.

4.122 Geißelfärbung

Es kam die Methode von PEPLER und ZETTNOW² in der Modifikation von BINGÖL¹ zur Anwendung:

1. Tanninlösung (Beize nach Pepler). Hierfür wurden 20 g Tanninsäure in 80 ml aqua dest. gelöst und erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden 15 ml einer 2,5%igen Chromsäurelösung hinzugegeben. Die Lösung blieb danach 4 - 5 Tage stehen und wurde vor dem Gebrauch filtriert.

* Typ Standard GFL, Carl Zeiß, Oberkochen/Württ.

2. Silbersulfatlösung

Fünf g Silbernitrat wurden in 30 ml aqua dest. gelöst und mit 30 ml einer Lösung von 5 g Magnesiumsulfat oder 6 g Natriumsulfat in aqua dest. gemischt. Das dabei als weißes Pulver ausgefallene Silbersulfat wurde mehrfach mit 20 ml aqua dest. gewaschen und das Volumen anschließend auf 500 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Zur Färbung wurde die gewonnene Lösung im Verhältnis 1:2 mit aqua dest. verdünnt und zu 100 ml dieser Verdünnung 30%iges wässriges Äthylamin solange hinzugegeben, bis ein sich bildender brauner Niederschlag von Silberoxid wieder gelöst war. Danach wurde nochmals tropfenweise konzentrierte Silbersulfatlösung hinzugefügt bis sich ein Niederschlag erneut zu bilden begann. Die gebrauchsfertige Lösung war dann klar und farblos.

3. Färbung

Die Objektträger mußten besonders gründlich gesäubert werden. Sie wurden mehrfach in 96%igen Alkohol getaucht und in der Flamme eines Bunsenbrenners abgebrannt. Danach wurde eine Suspension der zu untersuchenden Bakterien in aqua dest. aufgetragen, hitzefixiert und 2 - 3 Min. mit Tanninlösung gebeizt. Nach Wasserspülung wurde das Präparat mit Silbersulfatlösung bedeckt und 1 - 2 Min. erwärmt, ohne jedoch den Siedepunkt zu er-

reichen. Der Objektträger wurde darauf nochmals mit Wasser abgespült und anschließend 4 Tropfen einer 2%igen Sodalösung und 2 Tropfen einer 5%igen alkoholischen Pyrogallollösung aufgetragen. Der Pyrogallollösung waren pro 100 ml 10 Tropfen Eisessig zugegeben worden. Das Präparat wurde nochmals erwärmt, mit Wasser gespült, an der Luft getrocknet und mikroskopisch untersucht.

4.13 Biochemische Verfahren

4.131 Cytochromoxidase-Reaktion (KOVACS)³⁷

Eine 1%ige wässrige Lösung von N,N-Dimethyl-phenylen-diammoniumdichlorid* (A) und eine 1%ige alkoholische Lösung von Naphtol (B) wurden hergestellt. Kurz vor dem Test wurden 3 Teile der Lösung A zu 2 Teilen der Lösung B gegeben. Die zu untersuchende Kultur wurde auf Filterpapier ausgestrichen und mit 2 Tropfen des Cytochromoxidase-Reagens bedeckt. Bei einer positiven Reaktion trat nach durchschnittlich 20 - 30 Sekunden eine blauviolette Färbung an der Auftropfstelle ein.

4.132 Oxidative Glucose-Spaltung

Es wurde das Medium nach HUGH und LEIFSON²⁴ verwendet, dem nach dem Autoklavieren Glucose 1%ig zugesetzt worden war. Das in Reagenzgläser (Ø 6 mm) zu je 2 ml abgefüllte Medium wurde stichförmig beimpft und 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Die positive Reaktion

* Firma E. Merck, Darmstadt

war durch eine Gelbfärbung des zuvor blaugrünlischen Agars in der oberen Agarschicht gekennzeichnet.

4.133 Hämolyse

Das zur Feststellung der Hämolyse verwendete Blutagargrundmedium enthielt 0,1 % Pepton*, 0,5 % Fleischextrakt nach Liebig**, 0,2 % Natriumdiphosphat, 0,3 % Natriumchlorid und 2 % Agar***. Dem autoklavierten Medium wurde bei 52°C defibriniertes Schafblut im Verhältnis 9:1 hinzugefügt. Die Blutplatte wurde mit den zu testenden Bakterien 2 Tage bei 37°C bebrütet und anschließend abgelesen.

4.134 Gelatinespaltung

Der Gelatineagar bestand aus Nutrient-Agar*** mit Zusatz von 0,5 % Nutrient-Gelatin****. Jeweils 4 - 6 Kulturen wurden auf die Platte aufgebracht und nach 40 Stunden Bebrütung bei 37°C mit Ammoniumsulfat (gesättigte Lösung) überschwemmt. Eine positive Reaktion war durch eine Aufhellungszone gekennzeichnet.

4.135 Verhalten in Lackmusmilch

Die 50 Kulturen wurden auf TSA angezüchtet, auf Lackmusmilch übertragen und bei 37°C bebrütet. Sie wurden

* Firma E. Merck, Darmstadt
** Compagnie Liebig, Antwerpen
*** Difco Laboratories, Detroit, USA
**** Oxoid-Division of OXO LTD., London, England

täglich bis zu 14 Tagen auf Gerinnung, Peptonisierung, Reduktion und pH-Wert geprüft (KIELWEIN³⁰, KÖHLER³⁶).

4.136 Farbstoffbildung

Zur Untersuchung auf Farbstoffbildung wurde im wesentlichen das Medium nach KING, WARD und RANEY³¹ benutzt: Zehn g Bacto-Pepton*, 7,5 g Bacto-Agar*, 5,0 g Glycerin, 5,0 g K₂SO₄ und 1,5 g MgCl₂·(6 H₂O) wurden in 500 ml aqua dest. gelöst, auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und als Schrägagar in Reagenzgläser abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde der so vorbereitete Agar mit je einer Öse einer frischen auf TSA gewachsenen Kultur beimpft. Das Ergebnis wurde nach 48 Stunden Bebrütung bei 37°C abgelesen.

4.137 Wachstum in synthetischem Medium

1. Mit d+Glucose als alleiniger C-Quelle

Der Bouillon nach PULVERER und KORTH⁵⁰ wurde d+Glucose (2 %) zugegeben.

2. Mit d+Saccharose als alleiniger C-Quelle

Das Medium nach PULVERER und KORTH⁵⁰ enthielt 2 % d+Saccharose.

4.138 Elastase-Nachweis

Der Elastase-Nachweis erfolgte mit Nutrient-Agar, der 1 % Elastin*** und 0,04 m CaCl₂ in 0,03 m Tris-HCl-

* Difco Laboratories, Detroit, USA

** Oxoid-Division of OXO LTD., London, England

*** Sigma, St. Louis, Miss., USA

Puffer (pH 8,0) enthielt (MORIHARA⁴⁵, modifiziert von SCHARMANN⁵¹). Das Elastinpulver wurde in einem Teil des Puffers suspendiert und 1 - 2 Min. homogenisiert*, um eine möglichst feine Verteilung der Elastinpartikel und damit optimale Elastolysis zu erreichen. Die zu untersuchenden Keime wurden auf dem Elastin-Agar ausgestrichen und 7 Tage bei 37°C bebrütet. Positive Ergebnisse waren durch Auflösung des Elastins in Form einer Aufhellungszone um die Testkolonie gekennzeichnet (Abbildung 1)

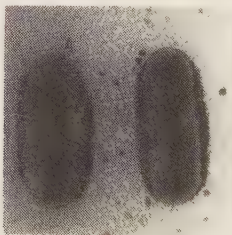


Abbildung 1:

Zwei elastin-positive Pseudomonas aeruginosa Kulturen. Die positive Reaktion wird durch Aufhellungszonen (dunkler Rand) um die Kulturen gekennzeichnet.

4.139 Wachstum bei 42°C im Glycerol-Mannitol-Acetamid-Cetrimid-Agar (GMAC)³⁰

Das GMAC-Medium enthielt in der Lösung A: 20,0 g Pepton, 1,4 g MgCl₂, 10,0 g K₂SO₄, 13,6 g Agar, 0,3 g Cetrimid (Cethyl-Trimethylammoniumbromid**), 5 g Glycerin und 5,0 g Mannit in 900 g aqua dest. (pH 6,8). Die Lösung A wurde 15 Min. bei 101°C autoklaviert.

* "Ultraturrax", Janke und Kunkel, Staufen i. Br.

** E. Merck, Darmstadt

Die Lösung B bestehend aus 10,0 g Acetamid und 0,012 g Phenolrot in 100 g aqua dest. (pH 6,8) wurde durch ein Seitz-Filter bakterienfrei filtriert.

Zu 90 ml der auf 50°C abgekühlten Lösung A wurden 10 ml der Lösung B gegeben und nach dem Mischen als Schrägagar in Reagenzgläser abgefüllt. Der Agar wurde inokuliert und 48 Stunden bei 42°C bebrütet. Wachstum von Ps. aeruginosa wurde durch einen Farbumschlag von gelb nach rotviolett angezeigt.

4.2 Typisierung der Ps. aeruginosa-Kulturen

4.21 Herstellung der Mitomycin C-Lösung

Das Mitomycin C* war in Form kristalliner Trockensubstanz in 2-mg-Ampullen vorhanden. Es wurde eine Lösung mit sterilem aqua bidest. hergestellt, die 30 µg Mitomycin C / ml enthielt.

4.22 Gewinnung von Pyocin

Die Präparation von Pyocin erfolgte im wesentlichen nach FARMER und HERMAN⁸. Eine durch Verdünnungsausschlag und 24stündiges Bebrüten bei 32°C gewonnene Einzelkolonie wurde in 10 ml TSB in 50-ml-Erlenmeyerkolben suspendiert. Nach 2 Stunden bei 32°C unter ständigem Schütteln in einem Wasserbad erreichte die Kultur eine optische Dichte von 0,4 bei 550 nm. Die

* Firma Sigma, Chemical Company, St. Louis, Miss., USA

Kultur wurde zu 20 ml TSB in 100-ml-Erlenmeyerkolben zugesetzt und bei 32°C weitere 2 Stunden bebrütet. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml Mitomycin C (1 µg / ml Bouillon). Dann wurde die Kultur weitere 6 Stunden bei 32°C bebrütet. Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wurde in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben das 5 ml Chloroform enthielt und mit einem Schraubverschluß versehen war. Nach kräftigem Schütteln wurde für 10 Min. bei 5000 x g zentrifugiert. Die obere Schicht (ca 10 ml) wurde abpipettiert und in einem sterilen Behälter bei +4°C aufbewahrt.

4.23 Zusammenstellung des Pyocin-Musters der Kulturen

Von den 50 Ps. aeruginosa-Kulturen wurde das Pyocin auf die oben beschriebene Weise gewonnen. Je eine Einzelkolonie aller 27 Indikatorstämme wurde in TSB bei 32°C suspendiert und auf eine optische Dichte von 0,4 bei 550 nm eingestellt. Ein ml dieser Lösung wurde auf vorher gut ausgetrocknete TSA-Platten pipettiert und mit einem Glasspatel auf der Agaroberfläche verteilt. Nach Eintrocknen der Indikatorsuspension wurden die Pyocine mit einem Typisiergerät* aufgetragen. Durch die Anbringung von jeweils 21 Ösen an den Enden eines

* Das Gerät wurde in Anlehnung an ein ähnliches Gerät des Institutes für Hygiene der Universität Göttingen in der Institutswerkstatt angefertigt.

horizontal gelagerten Armes ermöglichte das Gerät bei jedem Niederdruck des Hebelarmes jeweils 0,015 ml von 21 verschiedenen Pyocin-Lösungen aufzutropfen.

Die so vorbereiteten Platten wurden 14 Stunden bei 32°C bebrütet. Eine positive Reaktion zeigte sich in unterschiedlich stark ausgeprägten Lysiszonen, in denen die Bakterien des entsprechenden Indikatorstammes nicht oder nur schwach gewachsen waren.

Die Ergebnisse wurden mit folgenden Bezeichnungen versehen:

- + Völlige Wachstumshemmung des Indikatorstammes durch Pyocin der Testkultur
- (+) Schwache Wachstumshemmung des Indikatorstammes
- Keine Wachstumshemmung des Indikatorstammes

4.24 Pyocin-Empfindlichkeit

Bei dem Test auf Pyocin-Empfindlichkeit dienten die 50 Ps. aeruginosa-Kulturen als Indikatoren. Es wurde wieder jeweils eine Einzelkolonie auf eine optische Dichte von 0,4 bei 550 nm eingestellt und die Bakterien-suspension wie beschrieben auf der Agaroberfläche verteilt.

Die von den Pyocin-Produktionsstämmen A - U erhaltenen Pyocine wurden gleichzeitig auf je eine Indikatorplatte aufgetragen und 14 Stunden bei 32°C im

Brutschrank belassen. Das daraus resultierende Pyocin-Empfindlichkeitsmuster wurde wie folgt ausgewertet:

- + Starke Wachstumshemmung der Testkultur durch
eines der Standard-Pyocine
- (+) Schwache Wachstumshemmung der Testkultur
- Keine Wachstumshemmung der Testkultur
- P Phagenreaktion

4.241 Abgrenzung von Phagenreaktionen gegen- über pyocinbedingten Lysiszonen

Phagenreaktionen waren meist schon mit bloßem Auge von der Pyocin-Wirkung zu unterscheiden (Abbildung 2).

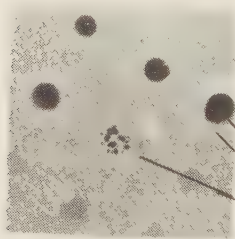


Abbildung 2:
Pyocin- und Phagenreaktionen
auf einem Pseudomonas aeruginosa-
Kulturrasen

Während die Pyocin-Lysis eine klare oder zumindest relativ scharf umrissene Aufhellung auf dem Agar bewirkte, war die durch phagenbedingte Lysis an stecknadelstich- bis stecknadelkopfgroßen Plaques zu erkennen. In Zweifelsfällen wurden die entsprechenden Platten mit dem LEDERBERG-Verfahren³⁸ auf eine frische TSA-Petrischale überstempelt und erneut 14 Stunden bei 32°C bebrütet. Pyocin-Reaktionen waren hierbei nicht mehr

wahrzunehmen, während Phagen-Plaques auch auf der neuen Platte sichtbar wurden.

Außerdem wurde die Fähigkeit des Pyocins durch den Agar zu diffundieren als Methode zur Abgrenzung gegenüber Phagenreaktionen verwendet (KÉKESSY und FIGUET²⁷). Die zu differenzierende Pyocin- bzw. Phagen-Lösung wurde auf in Plastikschaalen ausgegossenen TSA aufgetropft, der Agar mit einem Spatel von der Platte abgelöst und umgewendet. Der Indikatorstamm wurde sodann auf der anderen Agarseite aufgebracht und die Platte über Nacht bei 32°C bebrütet. Hatte es sich um eine Pyocin-Lysis gehandelt, so entstand auch bei diesem Verfahren eine Hemmzone im Indikatorwachstum. Phagen zeigten dagegen auf einer solchen Platte keine Wirkung.

Schließlich wurde noch bei allen schwierig zu interpretierenden Ergebnissen eine zehnfache Verdünnungsreihe der entsprechenden Pyocin-Lösung mit 0,14 m NaCl angelegt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden aufgetropft, wobei Phagen enthaltende Lösungen mit stärker werdender Verdünnung nur noch vereinzelt Plaques entstehen ließen.

4.25 Stabilität des Pyocins

Von den 21 Pyocin-Produktionsstämmen wurden zunächst die Pyocine A - U gewonnen und ihre Wirksamkeit gegenüber den 27 Indikatorstämmen erprobt. Die Pyocine H, I und U zeigten gegen die Indikatoren 19 und 27 starke Lysiszonen und wurden für die nachfolgend beschriebenen Versuche ausgewählt. Etwa 12 ml Pyocin-Lösung der genannten 3 Stämme wurden in sterile 50-ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert. Am Tag der Herstellung und an den folgenden 45 Tagen wurde in bestimmten Zeitabständen (Abbildung 5 und 6) eine Probe von 1 ml entnommen und gegen die Indikatorstämme 19 und 27 in einer zweifachen Verdünnungsreihe aufgetragen. Die ermittelten Konzentrationen wurden als reziproke Werte der jeweiligen Verdünnungsstufe angegeben. Als höchste Konzentration wurde eine gerade noch sichtbare Hemmzone gewertet.

4.26 Pyocin-Bildung pro Zeiteinheit

Je eine Einzelkolonie des für diese Versuche ausgesuchten Stammes wurde in drei 50-ml-Erlenmeyerkolben gegeben, die mit 12 ml TSB beschickt waren. Alle drei Kolben wurden 2 Stunden bei 32°C unter ständigem Schütteln bebrütet und danach in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben vereinigt. Von dieser Menge wurden je 10 ml in 3 Kolben

mit jeweils 20 ml TSB pipettiert und weitere 2 Stunden bebrütet. Anschließend erfolgte die Zugabe von Mitomycin C. Eine Stunde später begann die stündliche Probenentnahme von jeweils 3 ml fortlaufend aus den Kolben 1, 2 und 3. Nach dem Zentrifugieren ($5000 \times g$ / 10 Min.) unter Zugabe von 0,6 ml Chloroform zu den 3 ml Kulturflüssigkeit wurde 1 ml des Überstandes entnommen und eine zweifache Verdünnungsreihe in 0,14 m NaCl angelegt. Für den Test, der über 8 Stunden nach der Mitomycin C - Zugabe durchgeführt wurde, waren die Pyocine A - E und die Indikatorstämme 14, 19, 23 und 27 ausgewählt worden.

5.0 ERGEBNISSE

5.1 Identifizierung der 50 Testkulturen

5.11 Morphologie

Das Wachstum der 50 Testkulturen auf TSA wurde in Tabelle 2 aufgezeichnet.

Tabelle 2: Kolonienmorphologie der 50 Testkulturen
auf Trypticase-Soy-Agar

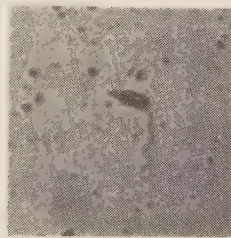
Anzahl der Kulturen	Kolonienmorphologie
15	Große Kolonien von graubrauner bis blauer Farbe (3 - 5 mm $\emptyset$) mit erhabenen Zentrum und flachem, unregelmäßig auslaufendem Rand
6	Metallisch glänzende, große Kolonien (3 - 5 mm $\emptyset$) mit nabelförmigem Zentrum und gelapptem Rand
28	Kleine Kolonien (1 mm $\emptyset$), von feiner, granulierter Struktur mit glattem Rand
1	Schleimige Kolonien mit intaktem Rand

Wurde die Anzüchtung auf besonders vorgetrocknetem Agar vorgenommen, so änderte sich teilweise die Wachstumsform der Kulturen mit zuvor unregelmäßigem Rand in Kolonien mit intakter Peripherie.

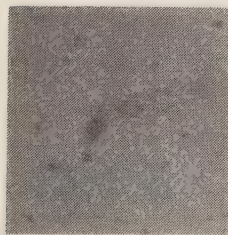
Alle Kulturen zeigten den charakteristischen Geruch nach Trimethylamin. Sie erwiesen sich bei phasenkontrastmikroskopischer Beobachtung als gut beweglich.

5.12 Färbung

Die 50 Kulturen bestanden aus gramnegativen Stäbchen von etwa 1,5 - 2,0 μm Länge und 0,5 - 0,8 μm Breite. Bei allen Kulturen war die überwiegende Anzahl der mikroskopisch dargestellten Keime stäbchenförmig und monotrich begeißelt (Abbildung 3a). Nur in drei Kulturen waren Bakterien mit 2 - 3 polar angeordneten Geißeln zu erkennen (Abbildung 3b).



3a



3b

Abbildung 3: Geißelfärbung nach PEPPLER und ZETTNOW²

3a monotriche Begeißelung

3b lophotriche Begeißelung

5.13 Biochemische Reaktionen

Die 50 Testkulturen zeigten eine positive Cytochrom-oxidase-Reaktion, waren hämolytisch und bauten Glucose oxidativ ab. Gelatine wurde von allen Kulturen gespalten. Das Verhalten in Lackmusmilch war durch Gerinnung, Peptonisierung und Reduktion gekennzeichnet. Nach 14tägiger Bebrütung wiesen alle in diesem Medium getesteten Kulturen einen pH-Wert von 7,2 bis 7,3 auf. Die Farbstoffbildung der Testkulturen ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

In einem synthetischen Medium mit d+Glucose als einziger Kohlenstoffquelle wuchsen alle Kulturen gut, dagegen nicht, wenn d+Saccharose als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet wurde.

Alle Kulturen waren deutlich elastase-positiv. Die Elastolyse war jedoch bei den einzelnen Kulturen unterschiedlich stark ausgeprägt. Starke Elastasebildner begannen bereits nach 36 Stunden bei 37°C das Elastin aufzulösen, während schwach elastase-positive Kulturen erst nach 7 Tagen ein deutliches Ergebnis zeigten.

Der abschließend durchgeführte Wachstumstest im GMAC-Agar bei 42°C erbrachte bei allen 50 Kulturen die für Ps. aeruginosa charakteristischen Reaktionen:

Tabelle 3:

Farbstoffbildung der 50 Pseudomonas aeruginosa-
Testkulturen im Medium nach KING, WARD und RANEY³¹

Stamm Nr.	Pyocyanin	Pyorubin	Fluorescein	dunkelbraunes Pigment
1	-	+	++	-
2	++	++	+	-
3	-	++	-	-
4	++	++	+	-
5	+	+	+	-
6	+	++	+	-
7	+	++	+	-
8	-	-	++	-
9	+	+	+	-
10	-	-	++	-
11	+	+	+	-
12	++	++	+	-
13	++	++	+	-
14	+	++	+	-
15	+	+	-	-
16	++	++	+	-
17	-	-	++	-
18	++	+	-	-
19	+	++	+	-
20	-	-	++	-
21	-	-	++	-
22	+	++	+	-
23	++	++	-	-
24	++	++	+	-
25	+	+	+	-
26	+	++	+	-

Fortsetzung der Tabelle 3 auf Seite 32

Fortsetzung der Tabelle 3

Stamm Nr.	Pyocyanin	Pyorubin	Fluorescein	dunkelbraunes Pigment
27	++	++	+	-
28	-	+	+	-
29	++	++	+	-
30	+	+	+	-
31	-	+	+	-
32	++	+	+	-
33	++	++	+	-
34	+	+	-	-
35	-	+	+	-
36	++	++	-	-
37	-	+	+	-
38	+	+	-	-
39	+	+	-	-
40	+	-	+	-
41	-	-	++	-
42	-	-	++	++
43	+	+	+	-
44	+	+	+	-
45	+	+	+	-
46	+	+	+	-
47	++	++	-	-
48	-	-	++	-
49	++	++	-	-
50	+	+	+	-

Zeichenerklärung:

+ Farbstoffbildung

++ starke Farbstoffbildung

- keine Farbstoffbildung

die Kulturen wuchsen bei 42°C und erzeugten auf dem Differenzierungsmedium einen Farbumschlag von gelb nach rotviolett.

5.2 Typisierungsergebnisse

5.21 Versuche zur Erzielung eines optimalen Wachstums der Indikatorkulturen

Es wurde zunächst ermittelt welche optische Dichte Einzelkolonien nach einer bestimmten Bebrütungsdauer in TSB erreichten, um sowohl bei der Herstellung der Indikatorlösungen als auch bei der Gewinnung der Pyocine von etwa den gleichen Voraussetzungen ausgehen zu können.

Alle 27 Indikatorstämme wurden auf TSA ausgestrichen und 24 Stunden bei 32°C im Brutschrank belassen. Eine Einzelkolonie von jeder Kultur wurde auf 10 ml TSB in Seitenarmflaschen überimpft und unter ständigem Schütteln bei 32°C bebrütet. Die optische Dichte der Bouillon wurde stündlich bei 550 nm* gemessen, wobei sich nach 2 Stunden Werte zwischen 0,3 - 0,5 OD ergaben. Die meisten Kulturen hatten nach dieser Zeit eine optische Dichte von 0,4 bei 550 nm erreicht (Tabelle 4). Diese Werte wurden für die weiteren Versuche als Ausgangspunkt benutzt.

* "Spectronic 20", Bausch und Lomb, Rochester, N.Y., USA

Tabelle 4:

Optische Dichte bei 550 nm von Trypticase Soy Broth,
die jeweils mit Einzelkolonien von Pseudomonas
aeruginosa - Indikatorstämmen inokuliert war

Indikator- Stämme	Bebrütung bei 32°C nach:		
	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden
1	0,1	0,4	0,6
2	0,2	0,5	0,7
3	0,1	0,4	0,6
4	0,1	0,4	0,6
5	0,1	0,3	0,5
6	0,1	0,4	0,6
7	0,1	0,4	0,6
8	0,2	0,5	0,7
9	0,2	0,5	0,7
10	0,1	0,4	0,7
11	0,1	0,4	0,6
12	0,1	0,4	0,6
13	0,1	0,3	0,5
14	0,1	0,4	0,6
15	0,2	0,5	0,7
16	0,2	0,5	0,7
17	0,1	0,4	0,6
18	0,1	0,4	0,6
19	0,1	0,4	0,6
20	0,1	0,3	0,5
21	0,1	0,4	0,6
22	0,2	0,5	0,7
23	0,2	0,5	0,7
24	0,2	0,5	0,7
25	0,1	0,4	0,6
26	0,1	0,4	0,6
27	0,1	0,4	0,6

Zur Bestimmung des günstigsten Wachstums des Indikatorkulturrasens auf TSA wurden in ersten Versuchen 0,01 ml einer 2 Stunden bei 32°C bebrüteten Einzelkolonie in 10 ml TSB pipettiert. Mehrere TSA-Platten wurden mit 2 ml dieser Verdünnung überflutet und der Rest abpipettiert. Es bildete sich ein unterschiedlich dichter Bakterienrasen, der bei einigen Stämmen brauchbar war, bei anderen dagegen nicht. Auch erneute Versuche mit schwächeren Verdünnungen brachten nicht den gewünschten Erfolg. Erst bei Applikation von 1 ml der unverdünnten Lösung die mit einem Glasspatel auf einer gut vorgetrockneten TSA-Platte verstrichen wurde zeigten alle 27 Indikatorstämme einen gleichmäßigen und für die Typisierung geeigneten Bakterienrasen.

5.22 Pyocin-Produktion

Von allen 50 Kulturen konnte nach Mitomycin C-Induktion Pyocin gewonnen und gegen die 27 Indikatorstämme aufgetragen werden (Tabelle 5). Aufgrund der daraus resultierenden 27 Charakteristika für jede Kultur wurde das Pyocin-Produktionsmuster zusammengestellt. Es war offensichtlich, daß einzelne Kulturen identische Pyocine bildeten. Die Kulturen 2 und 4, 6 und 7, 8 und 10, 12 und 13 und 17 und 20 wiesen ein jeweils korrespondierendes lytisches Bild auf. Alle übrigen Kulturen

hatten unterschiedliche Pyocinmuster. Eine Gruppenbildung war nicht feststellbar. Phagenwirkung konnte bei keiner der 1350 Einzelreaktionen ermittelt werden.

5.23 Pyocin-Empfindlichkeit

Die Pyocin-Empfindlichkeit der 50 Kulturen wurde in Tabelle 6 aufgezeichnet. Bei dieser Testmethode fiel eine deutliche Gruppenbildung auf. 16 Kulturen wiesen eine durchgehend positive Reaktion auf (Abbildung 4), während 4 Kulturen gegenüber allen Standard-Pyocinen unempfindlich waren. Weitere 9 Kulturen ließen sich in kleinere Gruppen mit wiederkehrendem Muster einordnen. Die übrigen 21 Stämme hatten ein "individuelles" Pyocin-Empfindlichkeitsbild.

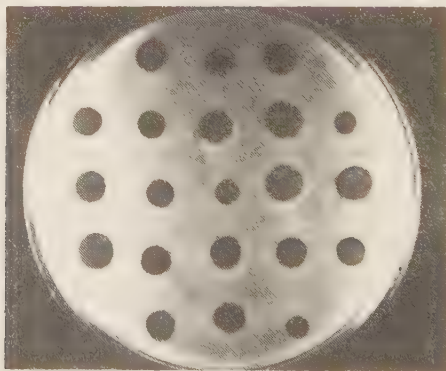


Abbildung 4: Gegen alle 21 Standard-Pyocine empfindliche Pseudomonas aeruginosa-Kultur

Tabelle 5: Pyocin-Produktion der 50 untersuchten Pseudomonas aeruginosa-Kulturen

Pyocin-Wirkungen auf die Indikatorstämme

Pyocin produzierende Testkulturen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	
2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	
3	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	
4	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	
5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	(+)	
6	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	(+)	+	
7	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	(+)	+	
8	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
9	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
10	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	(+)	-	+	
11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
13	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 38

Fortsetzung der Tabelle 5:

Pyocin produzierende Testkulturen	Pyocin-Wirkungen auf die Indikatorstämme																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
14	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+	-	+	-	-	(+)	-	+	+	-	-
16	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	(+)	(+)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	(+)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	-	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 39

Fortsetzung der Tabelle 5:

Pyocin produzierende Testkulturen	Pyocin-Wirkungen auf die Indikatorstämme																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
31	-	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
32	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	(+)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
35	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	(+)	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	(+)	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
37	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	(+)(+)	+	+	+	+	-	+
38	(+)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
39	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	(+)(+)	-	+	+	-	(+)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
42	+	+	(+)	-	+	+	-	+	+	-	(+)(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
43	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
44	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 40

Fortsetzung der Tabelle 5:

Pyocin produzierende Testkulturen	Pyocin-Wirkungen auf die Indikatorstämme																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
46	-	+	(+)	+	+	+	+	-	+	+	(+)	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
47	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	(+)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	(+)	+	-	+	-	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
49	-	-	(+)	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
50	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+

Zeichenerklärung:

- + Deutliche Wachstumshemmung
- (+) Schwache Wachstumshemmung
- Keine Wachstumshemmung
- P Phagenreaktion

Tabelle 6:

Pyocin-Empfindlichkeit der 50 untersuchten Pseudomonas aeruginosa - Kulturen

Untersuchte Kulturen als Indikatoren	Reaktionen mit den Standard-Pyocin-Lösungen																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	+	-	+	+	-	(+)	+	-	+	+	(+)	-	(+)	+	+	-	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 42

Fortsetzung der Tabelle 6:

Untersuchte Kulturen als Indikatoren	Reaktionen mit den Standard-Pyocin-Lösungen																				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
26	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	+	(+)(+)(+)	-	-	-	+	(+)(+)	-	-
27	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	P	(+)	-	(+)(+)(+)(+)	-	(+)(+)(+)(+)	-	(+)(+)(+)(+)	(+)(+)(+)(+)	P	P	P

Fortsetzung der Tabelle auf

Seite 43

Fortsetzung der Tabelle 6:

Untersuchte Kulturen als Indikatoren	Reaktionen mit den Standard-Pyocin-Lösungen																				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
29	-	-	-	+	-	-	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	+	-	(+)	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	-
32	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
33	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
34	-	(+)	-	+	(+)	+	+	P	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-	(+)	-
35	+	-	-	+	-	(+)	+	-	-	-	-	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-
36	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
38	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	(+)	-	+	-
39	-	-	-	+	-	(+)	+	-	-	-	-	+	+	-	-	(+)	(+)	-	-	+	-
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	(+)	-	-	-	-	+	+
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 44

Fortsetzung der Tabelle 6:

Untersuchte Kulturen als Indikatoren	Reaktionen mit den Standard-Pyocin-Lösungen																				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	-	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung:

- + Deutliche Wachstumshemmung
- (+) Schwache Wachstumshemmung
- Keine Wachstumshemmung
- P Phagenreaktion

5.24 Bestimmung identischer Stämme

Die Bestimmung der Identität einzelner Stämme wurde durch die Kombination der Pyocin-Produktionsmethode mit dem Pyocin-Empfindlichkeitstest vorgenommen. Hierbei entstand für jede Kultur ein lytisches Muster das sich aus 48 Einzelergebnissen zusammensetzte. Erst bei Übereinstimmung aller 48 Merkmale wurde die Identität zweier Stämme angenommen. Diese Voraussetzung lag bei den Stämmen 2 und 4, 6 und 7, 8 und 10, 12 und 13 und 17 und 20 vor. Unter den 50 untersuchten Kulturen konnten demnach mit diesem Verfahren 5 Stämme ermittelt werden, die jeweils mit 5 weiteren Stämmen identisch zu sein schienen.

5.3 Stabilität des Pyocins

Die Stabilität des Pyocins wurde mit den Standard-Pyocinen H, I und U und den Indikatorstämmen 19 und 27 getestet. (Abbildung 5 und 6). Von den bei +4°C gelagerten Pyocinen wurde zunächst an 5 aufeinanderfolgenden Tagen und dann in jeweils 10tägigem Abstand 1 ml entnommen und in einer 2fachen Verdünnungsreihe gegen die Indikatorstämme 19 und 27 aufgetropft. Das Pyocin H war auf die Indikatorstämme 19 und 27 bis zu einer Verdünnung von 1:128 wirksam. Das Pyocin U war auf die genannten Indikatorstämme bis zu einer Verdünnung von 1:4096 wirksam. Noch bis zum 15. Tag

der Probenentnahme war ein Abfall in der Stärke aller 3 Pyocine nicht zu erkennen. Am 25. Tag war bei Pyocin H gegenüber Indikatorstamm 19 und 27 und bei Pyocin U gegenüber Indikatorstamm 27 eine Abnahme der Stabilität um eine Verdünnungsstufe vorhanden. Eine langsame Schwächung der Stabilität war in den folgenden Proben zu beobachten.

5.4 Pyocin-Bildung pro Zeiteinheit

Es wurden die Standard-Pyocine A - E auf den Indikatorstämmen 14, 19, 23 und 27 getestet. Die Pyocin-Konzentration erreichte nach 5 - 6 Stunden ihr Maximum (Abbildung 7, 8, 9, 10 und 11) und wies nach weiteren 2 - 3 Stunden gleichbleibende Werte auf. Während gegenüber den Indikatorstämmen 14 und 19 die Konzentration der Pyocine jeweils gleich war, konnte bei den übrigen Indikatorstämmen eine unterschiedliche Wirksamkeit beobachtet werden. Gegenüber dem Indikatorstamm 23 zeigten alle 5 getesteten Pyocine die kleinste Wirkung.

Abbildung 5:

Pyocinstabilität nach Aufbewahrung bei +4°C

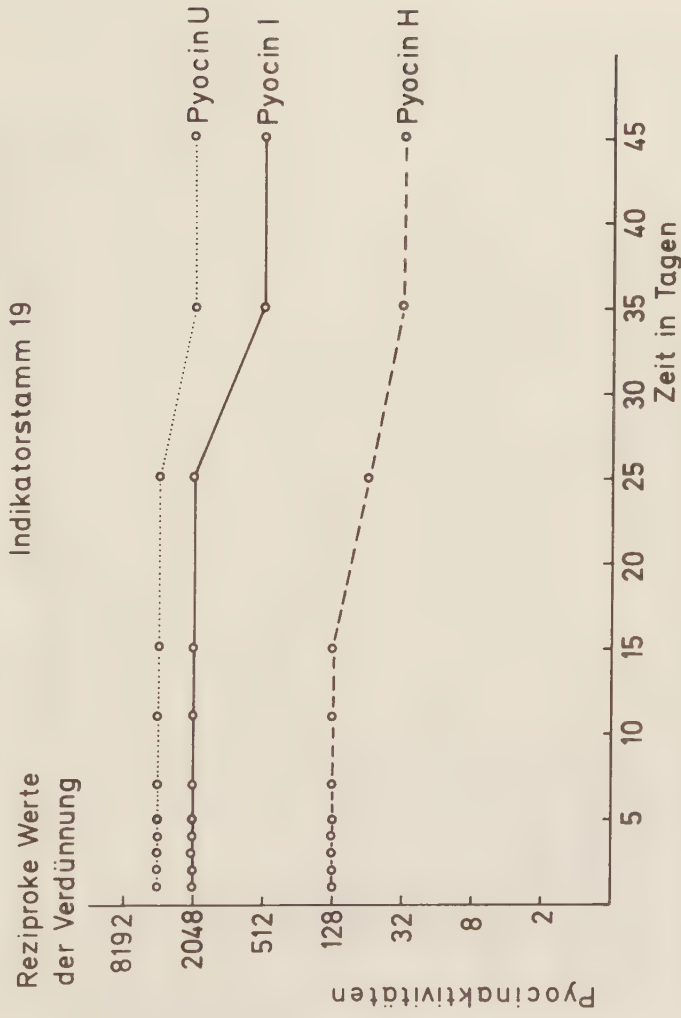


Abbildung 6 :

Pyocinstabilität nach Aufbewahrung bei +4°C

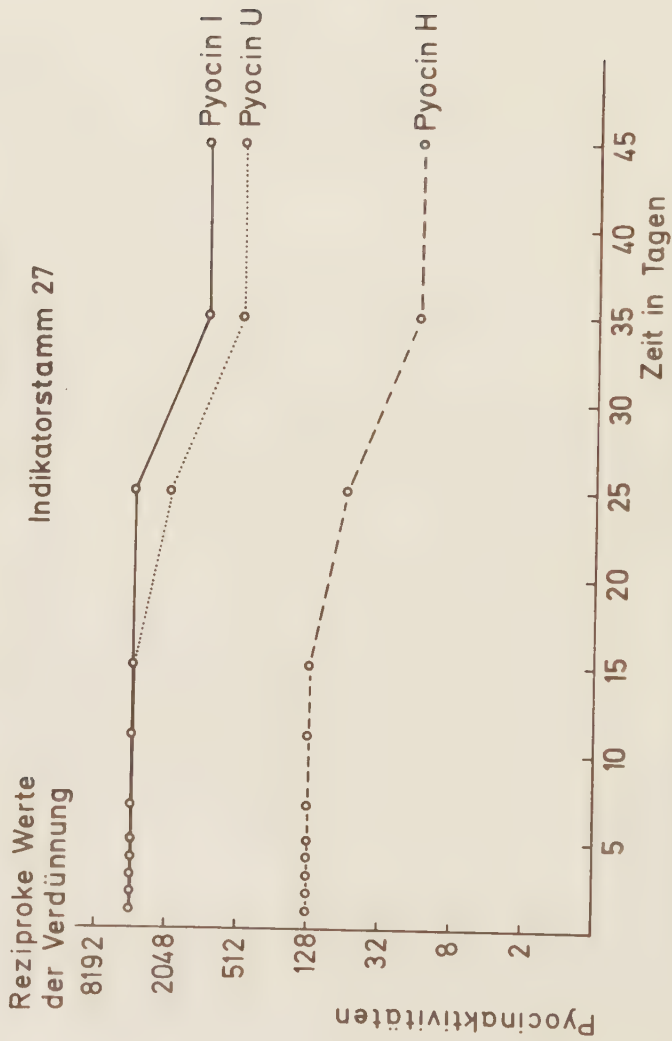


Abbildung 7:

Bildung von Pyocin A

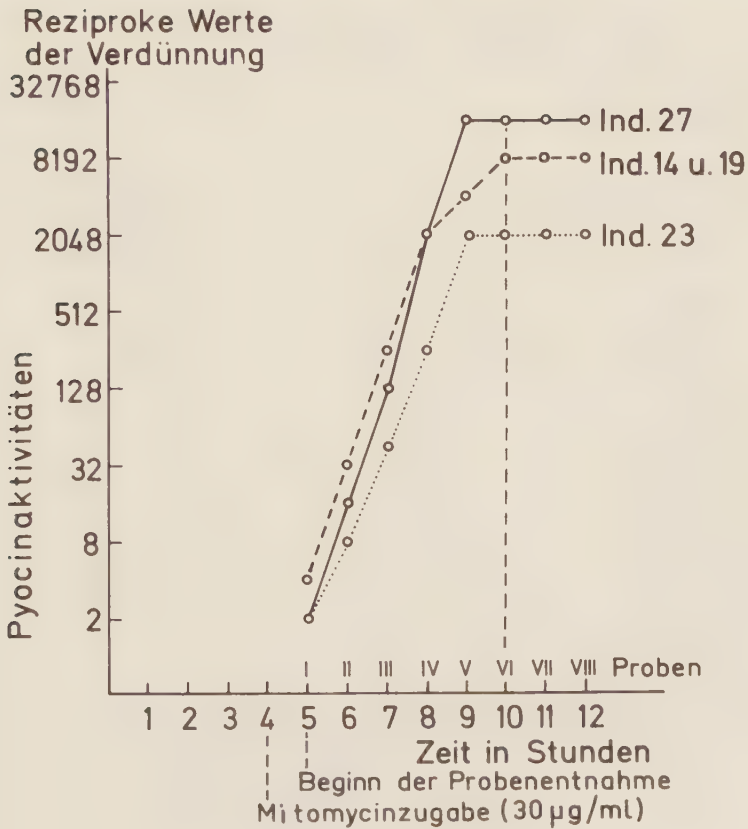


Abbildung 8 :

Bildung von Pyocin B

Reziproke Werte
der Verdünnung

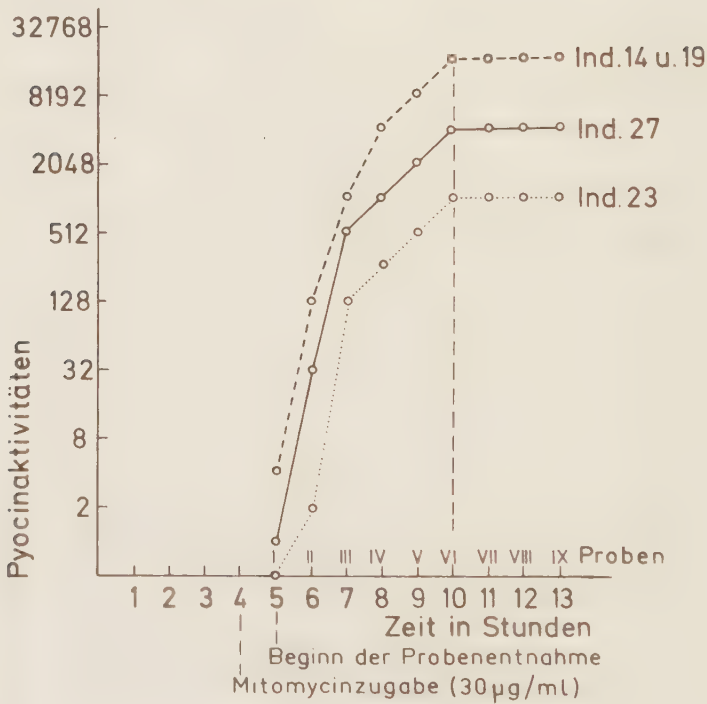


Abbildung 9:

Bildung von Pyocin C

Reziproke Werte
der Verdünnung

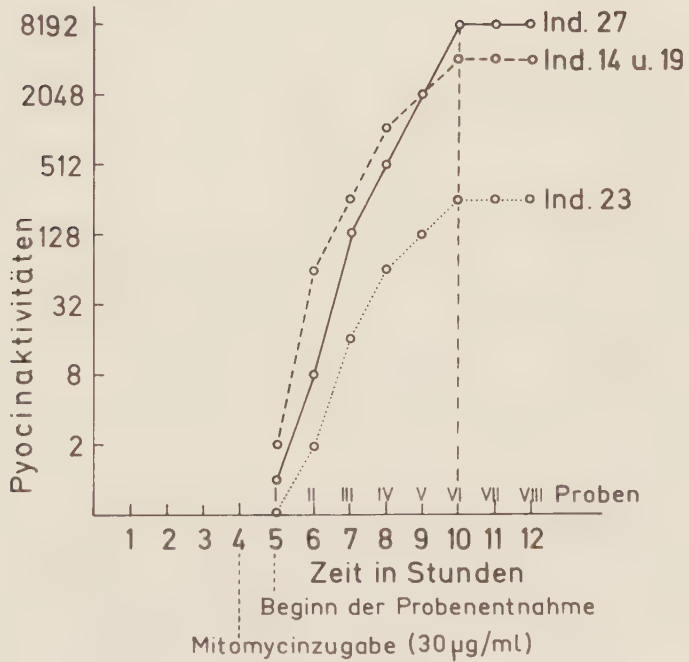


Abbildung 10 :

Bildung von Pyocin D

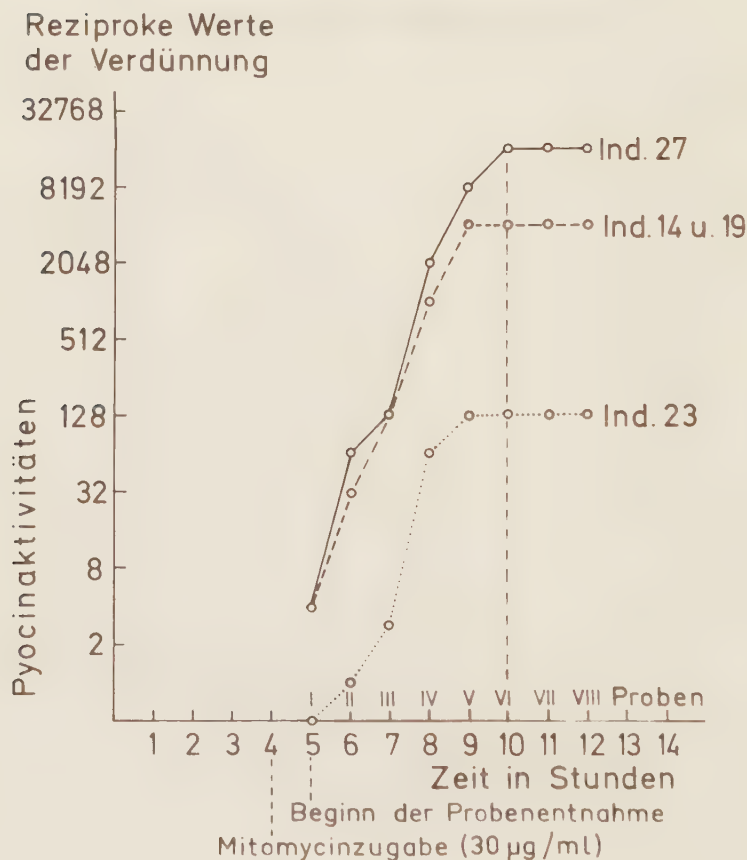
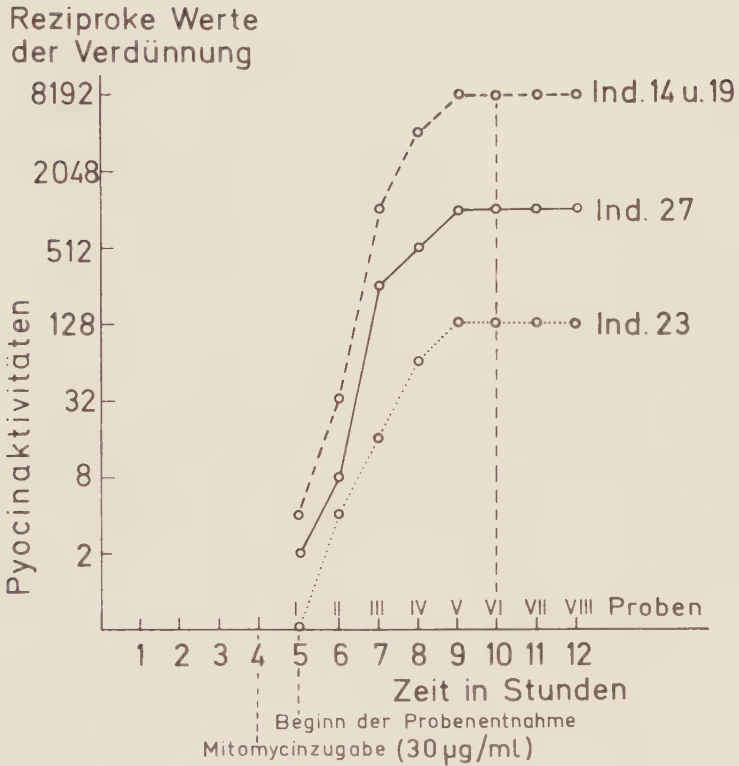


Abbildung 11:

Bildung von Pyocin E



5.5 Quantitative Bestimmung der Standard-Pyocine

A - U

Da dieselben Pyocine auf verschiedenen Indikatorstämmen unterschiedlich wirksam waren, erschien es notwendig, die Pyocine quantitativ zu ermitteln. Von den Pyocinen A - U wurden 10-fache Verdünnungsreihen angelegt und gegen die 27 Indikatorstämme aufgetragen. Die jeweils erreichten Konzentrationen wurden in den Verdünnungsstufen wiedergegeben, die eine gerade noch erkennbare Lyse bewirkten. (Tabelle 7). Dieses Verfahren könnte die Voraussetzung für die spätere Ermittlung einer Routine-Test-Dilution sein und zur Erstellung eines lytischen Spektrums dienen. Ausgehend davon könnten weitere Standardisierungen vorgenommen werden, die zur Erzielung von vergleichbaren Ergebnissen in verschiedenen Laboratorien notwendig sind.

Tabelle 7: Quantitative Bestimmungen der Standard-Pyocine *

Standard-Pyocine	Indikatorstämme																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
A	2			0	4	4		3				1	4		2	4	4	4	2		3	3		3			
B	2	2	2	2	4	5		3		2	2	2	4	4	2	2	4	4	2		2	3	2	2		3	
C	2			1	3	3		3			1	0	3		0	3	3	3	1		1	2		2		3	
D	2	2	2	2	3	4	3	2	2	1	0	3	1	3	3	4		3	3	2	2	2	1	2	3	4	
E	1	2		2	2	3			2	2	0	0	3		0	2		3	1		2	2	2	2		3	
F	2	1	1	3	2	2	2	1	2	2	0	1	1	2	2	1	2	3	1	2	2	1	2	1		3	
G	2	2	0	0	4	4		2	5	0	2	0	3			5	3	5	1	0	2	4	2	3		4	
H	1	0	2	3	2	1		2					2	2		2		2		0	0		1	1		2	
I	2	2	0	0	2	3		1	2		2		4			1		3	0		1	2		1	0	3	
J	1	0	3	1	3	1	1	1	P	0	3	0	1	3	2	3		3	0	1	1	1	1	1	1		3
K	1		2		P	2	0	3		2		1		2								2	2				
L	0		2				0	1	1	2	1	0	0		0			1	0			0	0	2			

* Zahlenangaben: $-\log_{10}$ (Verdünnungsstufen mit gerade noch sichtbarer Reaktion)

P : Phagenreaktion

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 56

Fortsetzung der Tabelle 7:

Standard- Pyocine	Indikatorstämme																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
M			0	2			3	1	3		3	0	2		2			0	0		2	1					
N			0	1			3	0	P		2	1	1		2	0	0				2	0				P	
O			2	2	P		4	1	3		3	4	3		3						2						
P			1	3			4	0	3		3	3	3		3			0			2	2					
Q			1	2			2	1	2		2	2	2		2			1			2	1					
R			1	2			4	P	3		2	2	3		2			0			2						
S	0			1			3	0	2		1	2									2	1					
T			1	1	P		4	1	3		2	0	2		2	0	1	0	1	1	0						
U	2	2	3	3	4	4	3		4	0		2	4	2	2	4	3	2	2	2	1	0					3

Zahlenangaben: $-\log_{10}$ (Verdünnungsstufen mit gerade noch sichtbarer Reaktion)

P : Phagenreaktion

6.0 DISKUSSION

Als Grundlage der Untersuchungen wurde zunächst eine eindeutige Identifizierung der 50 Kulturen als Ps. aeruginosa durchgeführt. Zur Identifizierung wurden die Kulturmorphologie, Färbeverfahren und mehrere biochemische Reaktionen verwendet (Bergey's Manual⁵).

Das Aussehen der Kulturen und ihr charakteristischer Geruch nach Trimethylamin, sowie die Beweglichkeit unter dem Phasenkontrastmikroskop gaben erste Anhaltspunkte für das Vorliegen der Gattung *Pseudomonas*. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Gramfärbung, die Gelatinespaltung, die positive Cytochromoxidase-Reaktion und die oxidative Spaltung von Glucose. Sowohl die Geißelfärbung als auch die Untersuchung auf Farbstoffbildung fielen nicht einheitlich aus, weshalb ihr Wert für die Erkennung der Artzugehörigkeit von *Pseudomonaden* vorsichtig zu beurteilen wäre. Auch in der Literatur liegen bezüglich der Begeißelung von Ps. aeruginosa uneinheitliche Meinungen vor (CASELITZ⁶, TILL⁵⁷, BOOTH³). Die Bildung von Pyocyanin wird als Erkennungsmerkmal für Ps. aeruginosa angesehen, ist aber keine "conditio sine qua non" (CASELITZ⁶). Alle Kulturen konnten

d+Glucose als einzige Kohlenstoffquelle verwerten, wuchsen aber nicht in Gegenwart von d+Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle. Das Verhalten in Lackmusmilch, die Hämolyse, die Fähigkeit zur Elastolyse und das Wachstum bei 42°C im GMAC-Medium wurden als Kriterien für die Artzugehörigkeit zu Ps. aeruginosa gewertet.

Das Typisierungsverfahren beruhte auf dem nebeneinander durchzuführenden Test der unbekannten Kulturen gegen 27 Indikatorstämme und der Verwendung von 21 Standard-Pyocin-Lösungen gegen die hierbei als Indikatoren benutzten Testkulturen. Es entstand daraus ein "epidemiologisches Fingerabdrucksystem", das sich aus 48 Charakteristika für jede Kultur zusammensetzte.

Um auch von schwachen Pyocin-Bildnern eine zur Typisierung ausreichende Pyocin-Konzentration zu erhalten, wurde den in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kulturen Mitomycin C zugegeben. Diese aus dem Aktinomyceten-Stamm "Streptomyces caespitosus" isolierte Substanz besaß eine antibiotische und cytostatische Wirkung und griff ähnlich wie ultraviolette Licht oder Röntgenstrahlen vorwiegend an den Nucleinsäuren der Zellen an (KERSTEN^{28,29}). FARMER⁸ erzielte mit Mitomycin C-

Behandlung eine nahezu 200fache Steigerung der Pyocin-Ausbeute. Auf diese Weise gelang es auch in der vorliegenden Arbeit, von allen 50 Kulturen eine zur Typisierung ausreichende Pyocin-Menge zu gewinnen.

Die Anzahl der Indikatorstämme zur Feststellung der Pyocin-Produktion wurde auf 27 erweitert. Dadurch hatte sich die Wahrscheinlichkeit der Identität zweier Stämme mit gleichem Muster gegenüber den bisher angewendeten Methoden erhöht (7, 11, 16, 48, 52, 64). Die zusätzlich getestete Pyocin-Empfindlichkeit war ein weiteres Hilfsmittel sowohl zur Feststellung der Identität zweier Teststämme als auch zur Charakterisierung des Einzelstammes. Alle Kulturen, die nach dem Test auf Pyocin-Empfindlichkeit einer Gruppe angehörten, konnten sicher mit der Pyocin-Produktionsmethode als "individueller Stamm" typisiert werden. Die Identität zweier Stämme wurde nur dann angenommen, wenn ihr Muster nach beiden Verfahren, also in 48 Merkmalen, übereinstimmte.

Schwierigkeiten bereitete teilweise die Unterscheidung zwischen schwachen Pyocin-Reaktionen und Phagenwirkung. Bei einzelnen Indikatorstämmen traten Phagenreaktionen zwar mit deutlich sichtbaren Plaques auf, in anderen Fällen konnte dagegen eine Unterscheidung nur durch das LEDERBERG-Verfahren³⁸, die

Methode nach KEKESY und FIGUET²⁷ und 10fache Verdünnungsreihen der betreffenden Kultur erreicht werden. In dem mit Pyocinen erzielten Typisierungs- bild waren Phagen-Reaktionen störende Faktoren. Sie mußten aber berücksichtigt werden, da die Empfindlichkeit eines Indikatorstammes gegenüber der gleichen, zu verschiedenen Zeiten hergestellten Pyocin-Phagen-Suspension Unterschiede aufwies (ZIERDT und SCHMIDT⁶⁵). Deshalb konnten 2 Stämme auch dann noch identisch sein, wenn sie nur in ihren Phagenbildern variierten. Der Anteil der durch Phagen hervorgerufenen Reaktionen in den Pyocin-Mustern war allerdings sehr gering. Deshalb wurde die Interpretation der Typisierungsergebnisse nur unwesentlich erschwert.

Alle Arbeitsgänge der Pyocin-Typisierung wurden bei einer Bebrütungstemperatur von 32°C durchgeführt. Diese Temperatur gab die Gewähr für eine ausreichende Pyocin-Produktion und klare Lysiszonen. Versuche mit 37°C erbrachten durch zu schnelles Wachstum der Indikatorstämme auf TSA unklare Ergebnisse. Bei 32°C noch gut erkennbare Lysiszonen wurden bei 37°C und gleicher Bebrütungsdauer durch einen zu dichten Indikatorrasen nicht mehr deutlich sichtbar.

Zwischen der Verteilung der Indikatorsuspension und dem Auftropfen der Pyocine sollte kein allzu großer Zeitabstand liegen, da sonst unklare lytische Bilder entstehen. Alle Arbeitsgänge wurden deshalb so eingeteilt, daß Pyocine und Indikatoren zur selben Zeit (am besten gegen Abend) bereit standen. Auf vorgetrockneten TSA-Platten war die Indikatorsuspension etwa innerhalb 1/2 Stunde eingezogen. Es konnte mit dem Auftropfen der Pyocine begonnen werden, die dann über Nacht wirksam wurden.

Die Methode der Pyocin-Typisierung war bei allen Arbeitsgängen im wesentlichen so beschaffen, daß auch in Laboratorien mit geringeren technischen Möglichkeiten eine solche Typisierung zur Aufdeckung von epidemiologischen Zusammenhängen durchführbar wird. Zur Erzielung vergleichbarer Ergebnisse wäre allerdings eine Standardisierung des Typisierungsverfahrens notwendig, die mit der quantitativen Bestimmung der Pyocine A - U begonnen wurde.

7.0 ZUSAMMENFASSUNG

Fünfzig Ps. aeruginosa-Kulturen wurden identifiziert und mit Pyocinen typisiert. Für die Pyocin-Typisierung wurden die Pyocin-Produktion und die Pyocin-Empfindlichkeit herangezogen. Alle 50 Ps. aeruginosa-Kulturen ließen sich mit der Pyocin-Typisierung charakterisieren. Die Identität zweier Stämme wurde bei Übereinstimmung von 48 Typisierungsmerkmalen angenommen. Nur 5 der 50 Kulturen waren mit jeweils weiteren 5 Kulturen identisch. Die Pyocine waren verhältnismäßig stabil. Sie blieben bei +4°C bis zu 15 Tagen unverändert aktiv. Eine quantitative Bestimmung der Pyocin-Stämme A - U wurde als Vorstufe für eine Standardisierung der Pyocin-Typisierung durchgeführt.

8.0 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bingöl, R. Serologische Untersuchungen an Vibri-
 onen unter besonderer Berücksich-
 tigung der Immunfluoreszenz
 Vet. med. Dissertation Gießen (1969)
2. Bongeot, J. Bakteriologische Diagnostik
 Verlagsbuchhandlung V.R.
 Schoetz, Berlin (1922)
3. Booth, E.V. Methods for studying the epidemiology
 of Pseudomonas aeruginosa in the
 hospital environment
 Can. J. Med. Technol. 214-223
 (Nachdruck) (1969)
4. Bradley, D.E. Ultrastructure of bacteriophages
 and bacteriocins
 Bacteriol Rev. 31, 230-314 (1967)
5. Breed, R.S. Bergey's Manual of Determinative
 Murray, E.G.D. Bakteriologie
 Smith, N.R. The Williams & Wilkins Company,
 Baltimore (1957)
6. Caselitz, F.H. Pseudomonas-Aeromonas und ihre human-
 medizinische Bedeutung
 Gustav Fischer Verlag, Jena (1966)
7. Darrell, J.H. Pyocine-typing of hospital strains of
 Wahba, A.H. Pseudomonas pyocyanea
 J. Clin. Path. 17, 236-242 (1964)

8. Farmer, J.J. Epidemiological fingerprinting of
Herman, L.G. Pseudomonas aeruginosa by production
of and sensitivity to pyocin and
bacteriophage
Appl. Microbiol. 18, 760-765 (1969)
9. Fierer, J. Pseudomonas aeruginosa epidemic traced
Taglor, P.M. to delivery-room resuscitators
Gezon, H.M. New Eng. J. Med. 276, 991-996 (1967)
10. Finland, M. Occurrence of serious bacterial in-
Jones, W.F. fections since introduction of anti-
Barnes, M.W. bacterial agents
J.A.M.A. 170, 2188-2197 (1959)
11. Gillies, R.R. Typing of Pseudomonas pyocyanea by
Govan, J.R.W. pyocine production
J. Path. Bact. 91, 339-345 (1966)
12. Goerttler, V. Die Bedeutung der Feststellung von
Bact. pyocyaneum im Präputium und im
Sperma bei Besamungsbullen
Mh. Vet. Med. 9, 9-12 (1954)
13. Götze, R. Paarungs- und Besamungsinfektionen
beim Rind
Dtsch. tierärztl. Wschr. 57, 377-382
(1950)
14. Gould, J.C. A study of the use of agglutinating
McLeod, J.W. sera and phage lysis in the classi-
fication of strains of Pseudomonas
aeruginosa
J.Path.bact. 79, 295-311 (1960)

15. Gould, J.C. Pseudomonas pyocyanea infections in hospitals
In: Infection in Hospitals:
epidemiology and control
Verlag R.E.O.Williams und R.A.Shooter
(Blackwell Scientific 52/b),
Oxford (1963)

16. Govan, J.R.W. Further studies in the pyocine typing
Gillies, R.R. of Pseudomonas pyocyanea
J. Med. Microbiol. 2, 17-25 (1969)

17. Graber, C.D. Bacteriophage grouping of Pseudomonas
Latta, R. aeruginosa: with special emphasis on
Vogel, E.H. lysotypes occurring in infected burns
Brame, R. Am. J. Clin. Path. 37, 54-62 (1962)

18. Grün, V.L. Differenzierung von Pseudomonas pyo-
Fillich, J. cyanea mittels Bakteriophagen
Heyn, U. Arch. Hyg. Bakt. 151, 640-646 (1967)

19. Habs, I. Untersuchungen über die O-Antigene
von Pseudomonas aeruginosa
Z. Hyg. 144, 213-228 (1957)

20. Hamon, Y. Contribution à l'étude des propriétés
Véron, M. lysogènes et bactériocinogènes dans
Péron, Y. le genre Pseudomonas
Ann.Inst.Pasteur 101, 738-753 (1961)

21. Higerd, T.B. In vitro and in vivo characterization
Baechler, Ch.A. of pyocin
Berk, R.S. J. Bacteriol. 98, 1378-1389 (1969)

22. Higerd, T.B. Morphological studies on relaxed and
Baechler, Ch.A. contracted forms of purified pyocin
Berk, R.S. particles
J. Bacteriol. 98, 1378-1389 (1966)
23. Holloway, B.W. Grouping Pseudomonas aeruginosa by
lysogenicity and pyocinogenicity
J. Path. Bact. 80, 445-450 (1960)
24. Hugh, R. The taxonomic significance of fer-
Leifson, E. mentative versus oxidative metabolism
of carbohydrates by various gramnega-
tive bacteria
J. Bact. 66, 24-26 (1953)
25. Ishii, S.I. The fine structure of a pyocin
Nishi, Y. J. Mol. Biol. 13, 428-431 (1965)
Egami, F.
26. Jacob, F. Biosynthèse induite et mode d'action
d'une pyocine, antibiotique de
Pseudomonas pyocyanea
Ann. Inst. Pasteur 86, 149-160 (1953)
27. Kékessy, D.A. New method for detecting bacteriocin
Piguet, J.D. production
Appl. Microbiol. 20, 282-283 (1970)
28. Kersten, H. Zur Wirkungsweise von Mitomycin C
I Einfluß von Mitomycin C auf den
Desoxyribonucleinsäure-Abbau in
ruhenden Bakterien
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.
329, 31-39 (1962)

29. Kersten, H. Zur Wirkungsweise von Mitomycin C
Kersten, W. II Einfluß von Mitomycin C, Chlor-
amphenicol und Mg^{++} auf den RNS- und
DNS-Stoffwechsel in Bakterien
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.
334, 141-153 (1963)
30. Kielwein, G. Die Isolierung und Differenzierung
von Pseudomonaden aus Lebensmitteln
Arch. Lebensmittelhyg. 2, 29-37 (1971)
31. King, E.O. Two simple media for the demonstration
Ward, M.K. of pyocyanin and fluorescin
Raney, D.E. J. Lab. Clin. Med. 44, 301-307 (1954)
32. Kleinmaier, H. Die O-Gruppenbestimmung von Pseudo-
monas-Stämmen mittels Objektträger-
Agglutination
Zbl. Bakt. (Abt. I Orig.) 170,
570-583 (1957)
33. Kleinmaier, H. Vergleichende Prüfung der Präzipi-
Müller, H. tation und Agglutination zur Be-
stimmung der O-Antigene von
Pseudomonas aeruginosa
Zbl. Bakt. (Abt. I Orig.) 172, 54-65
(1958)

34. Kleinmaier, H. Untersuchungen über die serodia-
Schreiner, E. gnostischen Differenzierungsmöglich-
Graeff, H. keiten und thermolabilen Antigene
von Pseudomonas aeruginosa
Zschr. Immun-Forschg. 115, 282-302
(1958)
35. Köhler, W. Zur Serologie der Pseudomonas
aeruginosa
Zschr. Immun.Forschg. 114, 282-302
(1957)
36. Köhler, W. Pseudomonas aeruginosa (Bact. pyo-
cyaneum) Cytologie, Biochemie und
Serologie
Wiss. Zschr. Univ. Rostock
Math.-nat.-Reihe 7, 25-79 (1957/58)
37. Kovacs, N. Identification of Pseudomonas pyo-
cyanea by the oxidase reaction
Nature, 178, 703 (1956)
38. Lederberg, J. Replica plating and indirect selec-
Lederberg, E. tion of bacterial mutants
J. Bact. 63, 399-406 (1952)
39. Lindberg, R.B. Definitive bacteriophage typing
Latta, R.L. system for Pseudomonas aeruginosa
Brame, R.E. Bact. Proc. 15, 81 (1964)
Moncrief, J.A.

40. Lowburg, E.J.L. Sources of infection with Pseudomonas
Thom, B.T. aeruginosa in patients with tracheo-
Babb, J.R. stomy
Whittall, K. J. Med. Microbiol. 3, 39-56 (1970)
41. Lücke, A. Die sogenannte blaue Eiterung und
ihre Ursachen
Arch. klin. Chir. 3, 135-157 (1862)
42. Mikkelsen, O.S. Serotyping of Pseudomonas aeruginosa
1. Studies on the production of
anti O sera
Acta path. microbiol. scand. 73,
373-390 (1968)
43. Mikkelsen, O.S. Serotyping of Pseudomonas aeruginosa
2. Results of an O group classifi-
cation
Acta path. microbiol. scand. Section B
78, 163-175 (1970)
44. Moncrief, J.A. Changing concepts in burn sepsis
Teplitz, C. J. Trauma 4, 233-245 (1964)
45. Morihara, K. Production of elastase and proteinase
by Pseudomonas aeruginosa
J. Bact. 88, 745-757 (1964)
46. Neumann, H.J. Bacterium pyocyaneum (Pseudomonas
Seeling, G. aeruginosa) als Mastitiserreger
Prakt. Tierarzt 9, 245-254 (1956)

47. Noble, W.C. Pseudomonas and man
White, P.M. Transactions St. John's Hosp.
Dermatol. Soc. 55, 202-208 (1969)
48. Osman, M.A.M. Pyocine typing of Pseudomonas
aeruginosa
J. Clin. Path. 18, 200-202 (1965)
49. Postic, B. Observations on bacteriophage
Finland, M. typing of Pseudomonas aeruginosa
J. Clin. Invest. 40, 2064-2075 (1961)
50. Pulverer, G. Zur Biochemie und Fermentstruktur
Korth, H. von Pseudomonas aeruginosa
Zbl. Bakt. I. Abt. 186, 36-54 (1961)
51. Scharmann, W. Persönliche Mitteilung
52. Sjöberg, L. Phage and pyocine typing of
Lindberg, A.A. Pseudomonas aeruginosa
Acta path. microbiol. Scand. 70,
639-640 (1967)
54. Society of Manual of Microbiological Methods
Bacteriologists Mc Graw-Hill Book Compagny New York,
Toronto, London (1957)
55. Stone, H.H. Control of infections in major
burns: With special emphasis on
Pseudomonas infections
J. Ped. Surg. 3, 3-11 (1968)

56. Sutter, V.L. A standardized system for phage
Hurst, V. typing Pseudomonas aeruginosa
Fennel, J. Health Lab. Sci. 2, 7-16 (1965)
57. Till, J. Untersuchungen zum Vorkommen und
zur Charakterisierung milchhygienisch
bedeutungsvoller Pseudomonaden
Vet. med. Dissertation Gießen (1969)
58. Tinne, J.E. Cross-infection by Pseudomonas
Gordon, A.M. aeruginosa as a hazard of intensive
Bain, W.H. surgery
Mackey, W.A. Brit. med. J. 4, 313-315 (1967)
59. Trommsdorf, R. Zur Kenntnis des Bakterium pyoganeum
und seiner Beziehungen zu den fluo-
reszierenden Bakterien
Zbl. Bakt. (I Abt. Orig.) 78,
405-414 (1952)
60. Van den Ende, M. Observations on the antigenic struc-
ture of Pseudomonas aeruginosa
J. Hyg. Camb. 50, 405-414 (1952)
61. Van den Ende, M. The bacteriophages of Pseudomonas
Phyllis, A. aeruginosa
Don, W. filtration, measurements and
Elford, J. electron microscopy
Challice, C.E. J. Hyg. (Camb.) 50, 12-20 (1952)
Dawson, I.M.
Hotchin, J.L.

62. Verder, E. A proposed antigenic schema for
 Evans, J. the identification of strains of
 Pseudomonas aeruginosa
 J. infect. Dis. 109, 183-193 (1961)
63. Williams, R. Cross-infection with Pseudomonas
 Williams, E.D. aeruginosa
 Hyams, D.E. Lancet 1, 376-379 (1960)
64. Zabransky, R.J. Pyocine typing of clinical strains
 Day, F.E. of Pseudomonas aeruginosa
 Appl. Microbiol. 17, 293-296 (1968)
65. Zierdt, C.H. Dissociation in Pseudomonas
 Schmidt, P.J. aeruginosa
 J. Bacteriol. 87, 1003-1010 (1964)

Herrn Professor Dr. H. Blobel danke ich
für die Themastellung und die jederzeit
gewährte fachliche Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor
Dr. G. Kielwein und Herrn Dr. W. Scharmann
für ihre stets hilfsbereite Beratung bei
der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 11. 12. 1936 wurde ich als Sohn des Bankkaufmannes Walter Kirchner und seiner Ehefrau Reta, geb. Gehring, in Berlin-Karlshorst geboren.

Nach vier Jahren Grundschule in Schulzendorf bei Berlin und Krempe/Schleswig-Holstein besuchte ich die Kaiser-Karl-Oberschule in Itzehoe und anschließend das Leibniz-Gymnasium in Wiesbaden, wo ich im Februar 1957 die Reifeprüfung bestand.

Danach studierte ich bis März 1964 Rechtswissenschaft an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main und an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Es folgte eine einjährige Tätigkeit als Sachbearbeiter am Hessischen Landeskriminalamt in Wiesbaden.

Am 12. 4. 1965 begann ich an der Justus Liebig-Universität in Gießen das Studium der Veterinärmedizin, das ich am 8. 7. 1970 mit bestandener Tierärztlicher Prüfung abschloß. Anschließend fertigte ich als Doktorand am Institut für Bakteriologie und Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen die vorliegende Dissertation an.

